

Rec'd PCT/PTO 03 MAR 2005
PCT/JP 03/11329

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

05.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 9月26日

出願番号
Application Number: 特願2002-280512
[ST. 10/C]: [JP 2002-280512]

出願人
Applicant(s): 株式会社生物技術研究所

REC'D 23 OCT 2003

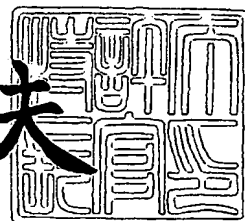
WIPO PCT

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 M-14-014

【提出日】 平成14年 9月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/02

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府富田林市若松町東1丁目9番32号 株式会社生物技術研究所内

【氏名】 勝山 巖

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 93012 カルフォルニア州、カマリロ、ワン・ユニバーシティ・ドライブ、カルフォルニア州立大学・チャネル・アイランズ、S & Tビルディング アライアンス・プロテイン・ラボラトリーズ内

【氏名】 荒川 力

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号 鹿児島大学農学部内

【氏名】 徳永 正雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4丁目6番1号 東京大学医科学研究所内

【氏名】 山本 雅

【特許出願人】

【識別番号】 301009597

【氏名又は名称】 株式会社生物技術研究所

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 a) 異種タンパク質の発現が可能であり、かつ呼吸能が欠損した酵母と被験試料とを接触させる工程、ここで、該異種タンパク質は該酵母の生育状態に変化をもたらしうるタンパク質である、

b) 該タンパク質を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに

c) 酵母の生育状態を測定する工程、

を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育が低下もしくは向上する場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】 異種タンパク質が、その非発現下と比べて発現下に該酵母の生育を低下させるものである、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するものである、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の G 0 / G 1 期の細胞内シグナル伝達に関与するものである、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 いずれかに記載のスクリーニング方法用の酵母。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 4 いずれかに記載のスクリーニング方法により得られうる生理活性物質。

【請求項 7】 請求項 5 に記載の酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、呼吸能が欠損した酵母を使用する生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

呼吸能が欠損した酵母を使用する技術としては、たとえば、異種のタンパク質の遺伝子を含むDNAで形質転換された当該酵母の形質転換体を使用するタンパク質の製造方法が知られている（たとえば、特許文献1参照）。当該文献においては、タンパク質の製造に用いられる酵母の呼吸能を欠損させることにより遺伝子の発現が高まることが開示されている。

【0003】

しかしながら、呼吸能が欠損した酵母を生理活性物質のスクリーニングに使用できることや、それにより当該スクリーニングの効率を高めることができることについての開示はない。

【0004】**【特許文献1】**

特開平2-418号公報（特許請求の範囲、第2頁）

【0005】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、生理活性物質を効率的にスクリーニングすることができる、呼吸能が欠損した酵母を使用する生理活性物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。また、当該方法に使用される酵母、該スクリーニング方法により得られうる生理活性物質、ならびに該酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キットを提供することを目的とする。

【0006】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、（1）細胞周期調節に関与する外来因子を酵母において発現させた場合に酵母の生育状態に何らかの変化を認めうること、（2）また、任意の物質の存在により当該酵母の生育状態が影響を受けうること、（3）影響を与える当該物質には前記外来因子に関連する何らかの生理活性の存在が示唆されること、（4）さらに、該酵母として呼吸能が欠損した酵母を使用することにより該物質の影響をより明確に捉えられることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、

〔1〕 a) 異種タンパク質の発現が可能であり、かつ呼吸能が欠損した酵母と被験試料とを接触させる工程、ここで、該異種タンパク質は該酵母の生育状態に変化をもたらさうるタンパク質である、

b) 該タンパク質を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに

c) 酵母の生育状態を測定する工程、

を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育が低下もしくは向上する場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法、

〔2〕 異種タンパク質が、その非発現下と比べて発現下に該酵母の生育を低下させうるものである、前記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔3〕 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するものである、前記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔4〕 異種タンパク質が、ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するものである、前記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔5〕 前記〔1〕～〔4〕いずれかに記載のスクリーニング方法用の酵母、

〔6〕 前記〔1〕～〔4〕いずれかに記載のスクリーニング方法により得られうる生理活性物質、ならびに

〔7〕 前記〔5〕に記載の酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キット、

に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法は、異種タンパク質の発現が可能であり、かつ呼吸能が欠損した酵母を、該異種タンパク質を発現可能な条件下、すなわち、該酵母の生育状態が変化しうる条件下に培養し、その際、該酵母を被験試料と接触させ、被験試料が存在しない場合（非存在下）を対照として被験試料が存在する場合（存在下）に酵母の生育が低下もしくは向上する場合に、被験

試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法である。

【0009】

本明細書において、「異種タンパク質」とは、酵母の生育状態に変化をもたらす酵母にとって異種のタンパク質をいう。「異種タンパク質」には、当該タンパク質と同様の機能を有するものである限り、その断片が含まれる。また、「異種タンパク質の発現が可能」とは、該酵母が異種タンパク質をコードする遺伝子を含有しており（すなわち、該酵母が該遺伝子で形質転換されており）、かつ当該タンパク質の発現が実際に可能であることをいう。また、「生理活性物質」とは、生体に対し何らかの生理作用を発揮する物質、たとえば、細胞の増殖や分化に作用する物質、特にホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に影響を与える化合物、たとえば、ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する化合物をいう。

【0010】

本発明のスクリーニング方法では、たとえば、被験試料の非存在下および存在下で異種タンパク質を発現する酵母の増殖曲線をそれぞれ作成し、得られた増殖曲線を対比することで、被験試料の非存在下を対照とした被験試料の存在下での当該酵母の生育状態に対する被験試料の影響を正確に把握することができるので、被験試料中の生理活性物質の存在を高い信頼性をもって検出することができる。従って、本発明のスクリーニング方法によれば、効率的に生理活性物質をスクリーニングすることができる。

【0011】

本発明に使用される酵母は、異種タンパク質の発現が可能であり、かつ呼吸能が欠損した酵母である。該酵母は本発明に包含される。該酵母は、異種タンパク質を発現していない状態（非発現下）と比べて発現している状態（発現下）で生育状態の変化、たとえば、生育の低下もしくは向上が認められるという性質を有する。また、異種タンパク質の発現を可能とした呼吸能を有する酵母に比べて、
（イ）本発明の酵母の生育状態の変化はより鋭敏であり、（ロ）異種タンパク質

の非発現下においてはより安定した生育を示す。これらは、酵母の呼吸能の欠損と関係するものと推定されるが未だそのメカニズムの詳細は不明である。しかしながら、前記（イ）は、前記（ロ）が認められるという事実を考慮すると、呼吸能の欠損に伴う、たとえば、異種タンパク質の発現量の増大（前記特許文献1参照）に単純に依存するものではない、と考えられる。

【0012】

「生育の低下」とは、異種タンパク質の非発現下および発現下での酵母の増殖曲線を得、それぞれの世代時間を求め、それらを対比した場合に、非発現下に比べて発現下に酵母の世代時間が長くなることをいう。また、世代時間の代わりに増殖速度を求めてもよい。その場合、対数増殖期の増殖曲線の傾きが小さくなることをいう。一方、「生育の向上」とは、非発現下に比べて発現下に酵母の世代時間が短くなることをいう。また、対数増殖期の増殖曲線の傾きが大きくなることをいう。「生育状態の変化がより鋭敏である」とは、同一種の異種タンパク質を発現する酵母個体間でバラツキなく一様な生育状態の変化が認められることをいう。「安定した生育」とは、同一種の異種タンパク質の非発現下にある酵母個体間でバラツキなく一様な生育状態が示されることをいう。

【0013】

増殖曲線は酵母の培養時間に対して増殖の程度を示す任意のパラメータ（たとえば、後述の酵母培養液の濁度等）の値をプロットすることにより作成する。本発明の酵母の性質の具体的な評価方法については後述する。

【0014】

異種タンパク質としては、酵母の生育状態に変化をもたらしうるタンパク質であれば特に限定されるものではない。当該タンパク質としては、好ましくは酵母の生育を低下もしくは向上させうるタンパク質であり、より好ましくは酵母の生育を低下させうるタンパク質である。また、当該タンパク質としては、好ましくは細胞の増殖や分化に関わるタンパク質、より好ましくはホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質である。中でも、ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質が特に好ましい。

【0015】

ここで、「ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質（以下、シグナルタンパク質という）」とは、ホ乳類細胞における細胞周期のうちG0期からG1期およびG1期からS期に至る過程に関与し、その進行または停止を制御する機能を有するタンパク質をいう。また、「ホ乳類細胞」とはホ乳類に由来する細胞であればよく、たとえば、ヒト、サルなどの霊長類、マウス、ラット、モルモットなどのげっ歯類、ウシ、ブタなどの偶蹄類、ネコなどの食肉類、ゾウなどの長鼻類、ウマなどの奇蹄類、家兎などのウサギ類、コウモリなどの翼手類、カンガルー、ワラビーなどの有袋類、カモノハシ、ハリモグラなど単孔類等由来の細胞が挙げられる。

【0016】

シグナルタンパク質は一般に、それが酵母で発現された場合、酵母の生育を低下させる性質を有すると考えられる。かかるシグナルタンパク質としては、たとえば、Tobファミリーに属するタンパク質、Cafファミリーに属するタンパク質、サイクリンファミリーに属するタンパク質、CDK(cyclin dependent kinase)ファミリーに属するタンパク質、Rb(retinoblastoma)ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p53ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p21ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、GADD45(growth arrest and DNA damage inducible)ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、E2Fファミリータンパク質に属するタンパク質、p15ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p16ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、Arfファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、INK4ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、TGF β ファミリーに属するタンパク質、ヒストンジエステラーゼ類等が挙げられる。

【0017】

Tobファミリーに属するタンパク質は、そのアミノ酸配列のN末端領域に、通常、配列番号：1に示すアミノ酸配列と相同性をもつ約110アミノ酸残基からなる相同性領域を有する。従って、当該タンパク質としては、①N末端領域に配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、もしくは②該相同性領域を有するタンパク質が好ましい。前記②のタンパク質としては、その発現下に酵母の生育の低下をもたらさうるものである限り、そのN末端領域に、配列番号：1のア

ミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよく、また、配列番号：1のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0018】

さらに、Tobファミリーに属するタンパク質の前記相同性領域には、N末端から100アミノ酸残基までの領域に配列番号：2に示すアミノ酸配列からなるBox A（GR Boxともいう）と呼ばれるさらに相同性の高い領域（高度保存領域）が存在することが知られている。また、Tobファミリーに属するタンパク質には、前記相同性領域に、当該Box Aに加えて配列番号：3に示すアミノ酸配列からなるBox Bと呼ばれる高度保存領域の存在が知られているものもある。Box AおよびBox Bについては、Tirone, F., (2001) J. Cell Physiol., 187, 155-165を参照されたい。たとえば、Box AおよびBox Bの存在が知られているTobファミリーに属するタンパク質について具体的にそれらのアミノ酸配列上の位置を示せば、hTobはN末端から40～58位にBox Aを76位～95位にBox Bを有し、hTob2はN末端から40～58位にBox Aを76位～96位にBox Bを有し、Pc3はN末端から50～68位にBox Aを124位～143位にBox Bを有し、h AnaはN末端から42～60位にBox Aを88位～117位にBox Bを有し、mBtg3はN末端から42～60位にBox Aを88位～117位にBox Bを有し、hPc3はN末端から42～60位にBox Aを88位～117位にBox Bを有する。よって、Tobファミリーに属するタンパク質としては、その発現下に酵母の生育の低下をもたらすものである限り、N末端から100アミノ酸残基までの領域に配列番号：2のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0019】

Tobファミリーに属するタンパク質としては、Box AおよびBox Bを共に有する

ものが好ましい。

【0020】

Cafファミリーに属するタンパク質は、hCaf1に代表される。hCaf1は配列番号：4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質である。Cafファミリーに属するタンパク質としては、その発現下に酵母の生育の低下をもたらさうるものである限り、配列番号：4のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよく、また、配列番号：4のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0021】

なお、前記「少なくとも1つ」とは1もしくは複数の意である。また、本明細書において「N末端領域」という場合、当該領域はアミノ酸配列でN末端から始まり、N末端から400残基までの領域をいう。

【0022】

アミノ酸配列の配列同一性とは、2つのアミノ酸配列間におけるアミノ酸残基の配列類似性をいう。配列同一性は、比較対象のアミノ酸配列の領域に渡って最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定されうる。

【0023】

配列同一性の数値（パーセンテージ）は、両方の配列に存在する同一のアミノ酸残基を決定して適合部位の数を決定し、次いで、比較対象の配列領域内のアミノ酸残基の総数で、前記適合部位の数を割り、得られた数値に100を乗ずることにより算出される。配列同一性は、配列解析ソフト、たとえば、BLASTP、FASTA等のネットワークサービスを利用して求めることができる。

【0024】

たとえば、Tobファミリーに属するタンパク質としては、たとえば、Tob、Tob2、Btg1、Pc3/Tis21/Btg2、Ana/Btg3、B9.10、Pc3K、Pc3B、B9.15等が挙げられる

。Cafファミリーに属するタンパク質としては、たとえば、Caf1、Caf2、POP2等が挙げられる。また、サイクリンファミリーに属するタンパク質としては、たとえば、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD1、D2、D3、サイクリンE等が挙げられる。

【0025】

本発明の酵母としては、本発明の所望の効果の発現の観点から、少なくともその活性部位を活性のある状態で保持してなる異種タンパク質（もしくはその断片）を発現可能であるものが好ましい。なお、本明細書において、断片でない、いわゆる完全タンパク質としての異種タンパク質とは、そのアミノ酸配列の全長からなる完全なタンパク質または1もしくは複数個のアミノ酸残基が欠失、付加等された実質的に完全なタンパク質をいう。一方、その断片とは完全タンパク質としての異種タンパク質の一部分をいう。かかる断片は、好ましくは5残基以上、より好ましくは5～100,000残基、さらに好ましくは10～50,000残基、特に好ましくは100～10,000残基のアミノ酸からなるペプチドであるのが好適である。当該断片としては、たとえば、シグナルタンパク質の活性部位を含む、好ましくは5残基以上、より好ましくは5～100,000残基、さらに好ましくは10～50,000残基、特に好ましくは100～10,000残基のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。

【0026】

「活性部位」とは、異種タンパク質がその活性を発揮するのに必要な部位をいう。たとえば、シグナルタンパク質では、細胞周期のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与する機能を発現するために必要な部位に相当する。シグナルタンパク質の活性部位のアミノ酸配列上の位置および当該部位を構成するアミノ酸配列については未だ不明であるが、たとえば、Tobの活性部位は、前記相同性領域に存在するものと推定される。Tobの活性部位を構成すると推定される相同性領域のアミノ酸配列を配列番号：1に示す。

【0027】

また、「活性のある状態」とは、活性部位が活性発現に必要な高次構造を有してなることをいう。たとえば、シグナルタンパク質またはその断片の場合、それ

らが活性部位を活性のある状態で保持してなるものであるか否かは、その発現下に酵母の生育の低下が生ずるか否かにより評価することができる。すなわち、酵母の生育の低下が生じた場合、発現したシグナルタンパク質またはその断片は活性部位を活性のある状態で保持してなるものである、と判定する。

【0028】

本発明の酵母としては、Tobファミリーに属するタンパク質および／またはCafファミリーに属するタンパク質を発現可能なものが好ましく、中でもTobファミリーに属するタンパク質およびCafファミリーに属するタンパク質の両方を共に発現可能なものがより好ましい。たとえば、TobとCaf1を酵母において同時に発現させた場合、それらを各々単独で発現させる場合よりも酵母の生育の低下が増大する。それゆえ、Tobファミリーに属するタンパク質およびCafファミリーに属するタンパク質の両方を共に発現させることにより、酵母の生育の低下をより明確に捉えることが可能であると考えられる。より具体的には、Tobファミリーのタンパク質としてTob、Tob2、Btg1、Pc3/Tis21/Btg2、Ana/Btg3、B9.10、Pc3K、Pc3B、B9.15を、Cafファミリーのタンパク質としてCaf1、Caf2、POP2を、また、Tobファミリーのタンパク質とCafファミリーのタンパク質の組合せとして、ここに具体的に示すそれらのタンパク質の少なくとも1つずつの組合わせを発現可能な酵母が、本発明の所望の効果の発現の観点から、特に好ましい。

【0029】

本発明の酵母は、(i) 異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子で酵母を形質転換し、得られた酵母の呼吸能欠損株を得ることにより、または(ii) 呼吸能欠損株を得た後、それを異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子で形質転換することにより、得ることができる。

【0030】

異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子による酵母の形質転換は、当該遺伝子を含むベクター、好ましくは発現ベクターを酵母に導入することにより行うのが好適である。

【0031】

発現ベクターは、通常、プロモーター、異種タンパク質をコードする遺伝子お

よびターミネーターを含んでなる。該遺伝子はプロモーターに発現可能に連結される。ここで、「プロモーターに発現可能に連結される」とは、遺伝子にコードされるタンパク質の発現がプロモーターの制御下に誘導されうるように該遺伝子が該プロモーターに連結されることをいう。また、該発現ベクターは、多くの場合、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、ならびに大腸菌で機能する複製起点を含んでなる。さらに、エンハンサーおよび酵母で機能する複製起点が含まれていてもよい。発現ベクターを構成するこれらの要素の配置関係は所望の効果を奏しうるように適宜決定することができる。

【0032】

このような発現ベクターは、たとえば、酵母ベクターとして知られるYIp型、YEp型、YRp型、YCp型の任意のプラスミドベクターにプロモーター、マルチクロニングサイト、ターミネーター等をこの順で導入した後、異種タンパク質をコードする遺伝子上流に翻訳開始コドン、下流に翻訳終止コドン付加したものを前記マルチクロニングサイトに導入することにより構築することができる。このような組換え発現ベクターの構築には慣用の組換えDNA技術を利用できる（たとえば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989等参照）。前記プラスミドベクターとしては、シグナルタンパク質の発現量が多量である方が好ましいという観点から、YEp型のプラスミドベクターが望ましい。もしくはプラスミドベクターの宿主内保持安定性が高いという観点からYCp型のプラスミドベクターが望ましい。当該ベクターとしては、たとえば、YEp24、YEp13等が挙げられる。

【0033】

前記プロモーターとしては、たとえば、発現誘導可能なAOX1、GAL1、GAL7、GAL10、LAC4、PHO5、SUC2等のプロモーターが好適に使用される。また、非誘導型のADH、PGK等の解糖系の酵素のプロモーターを使用してもよい。ターミネーターは使用するプロモーターに応じて任意のものを選択すればよい。選択マーカー遺伝子として使用する抗生物質耐性遺伝子としては、たとえば、大腸菌用としてのアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、酵母用としてのG418耐性遺伝子等が挙げられる。また、栄養要求性変異を相補する遺伝子としては、LE

U2、URA3、TRP1、HIS4、ADE2等が挙げられる。

【0034】

また、本発明の発現ベクターの構築には、予めGAL1等のプロモーターが組み込まれた種々のベクターを利用することもできる。かかるベクターとしては、たとえばpESC Yeast Epitope Tagging Vectors (Stratagene社製) 等が挙げられる。さらに、酵母において発現される異種タンパク質にタグ付加を所望する場合においても、前記pESC Yeast Epitope Tagging Vectorsにはタグがついているのでそれを用いればよい。この場合、タグに特異的な抗体もしくは特異的な親和性を用いて目的タンパク質の検出および精製を行うことができるという利点がある。

【0035】

所望の異種タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列についての情報は、たとえば、ジーンバンク (GenBank) より入手可能である。異種タンパク質の好適な例としてのシグナルタンパク質をコードする遺伝子の例を挙げておく。たとえば、Tobファミリーに属するタンパク質およびCafファミリーに属するタンパク質をそれぞれコードする遺伝子について、以下に各遺伝子名と対応するアクセッション番号を例示する：tob (アクセッション番号：D38305 (ヒト) ; D78382 (マウス))、tob2 (アクセッション番号：AB035207 (ヒト) ; AB041225 (マウス))、btg1 (アクセッション番号：X61123 (ヒト) ; L16846 (マウス) ; X64146 (G. domesticus))、pc3/tis21/btg2 (アクセッション番号：M60921 (ラット) ; M64292 (マウス) ; Y09943 (ヒト))、ana/btg3 (アクセッション番号：NM006806.1 (ヒト) ; Z72000 (マウス))、b9.10 (アクセッション番号：X73316 (X. leevis))、pc3B (アクセッション番号：AJ271351.1 (ヒト) ; AJ005120 (マウス))、b9.15 (アクセッション番号：X73317 (X. leevis))、caf1 (アクセッション番号：L46722 (ヒト) ; U21855 (マウス))、pop2 (アクセッション番号：D12807 (Saccharomyces cerevisiae))。また、pc3Kおよびcaf2については、Prevot, D., Morrel, A-P., Voeltzel, T., Rostan, M-C., Rimokh, R., Magaud, J-P., and Corbo, L. (2001) J. Biol. Chem., 276, 9640-9648およびBeko, Z., Sopiczki, M., and Carr, A.M. (1998) Mol. Gen. Genet., 260, 434-443を参照されたい。

【0036】

得られた塩基配列についての情報に基づいて一対のプライマーを作製し、鋳型DNAとして、たとえば、ヒトのゲノムDNAもしくはcDNAライブラリーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことにより、異種タンパク質、たとえば、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を適宜増幅することができる。

【0037】

たとえば、TobファミリーもしくはCafファミリーに属するタンパク質として、前記する特定のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を所望する場合には、たとえば、当該アミノ酸配列をコードする遺伝子に対し公知のランダム変異導入法や部位特異的変異導入法により所望の変異を導入し、得られた遺伝子を酵母導入用の遺伝子として用いればよい。また、たとえば、シグナルタンパク質の断片の発現を所望する場合には、たとえば、所望の断片をコードする遺伝子領域のみが増幅されるように適宜プライマーの配列を選択してPCRを行い、得られた遺伝子を酵母導入用の遺伝子として用いればよい。また、該断片の発現は、シグナルタンパク質をコードする遺伝子の任意の位置にストップコドンを導入して発現させる方法や制限酵素により所望の部分ペプチドに対応する遺伝子領域を切り出し、適切な発現ベクターに導入して発現させる方法等によっても行うことができる。

【0038】

通常、酵母の形質転換は1種の異種タンパク質をコードする遺伝子を含有してなる1種の発現ベクターを用いて行えばよい。たとえば、tobもしくはcaf1を含有してなる1種の発現ベクターで酵母を形質転換する。他方、それぞれ1種の異種タンパク質をコードする遺伝子を含有してなる2種以上の発現ベクターで、あるいは2種以上の異種タンパク質をコードする遺伝子を含有してなる1種の発現ベクターで酵母を形質転換してもよい。たとえば、tobを含有してなる1種の発現ベクターとcaf1を含有してなる1種の発現ベクターとを用いて、あるいはtobとcaf1とが間接的に連結されてなる遺伝子部分を含有してなる1種の発現ベクタ

ー（以下、タンデム化発現ベクターという）で酵母を形質転換する。

【0039】

該タンデム化発現ベクターは、たとえば、以下のようにして得られる。たとえば、単一の発現ベクター内において、*tob*および*caf1*の転写がそれぞれ別個のプロモーターによって制御を受けることができるように、*tob*等の遺伝子とプロモーターとを当該ベクター内に配置する。なお、これらの方法において使用されるプロモーターやその他の要素等は前記と同様である。

【0040】

また、異種タンパク質をコードする遺伝子を相同組換えにより酵母の染色体へ挿入してもよい。たとえば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある2つの塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランキング配列の間に、たとえば、*tob*等の遺伝子を配置してなるベクターを用いて酵母を形質転換すればよい。標的挿入部位としては、当該部位に*tob*等の遺伝子を挿入することで酵母の内因性プロモーターと該遺伝子とが発現可能に連結されうる部位が好ましい。かかる場合には、*tob*等の遺伝子は、酵母の内因性プロモーターの制御下に発現可能となるため、形質転換に用いるベクター中、該遺伝子はプロモーターと発現可能に連結されている必要は必ずしもない。一方、ベクター中、*tob*等の遺伝子を、たとえば、発現誘導型のプロモーターと発現可能に連結しておき、プロモーターと共に該遺伝子を染色体に挿入し、外部より発現制御可能となるようにしてもよい。このようなベクターの構築には、YIp型ベクターのような組み込み型ベクターが好適に使用される。

【0041】

前記のベクターによる酵母の形質転換は慣用の手法により行うことができる。たとえば、酢酸リチウム法 (Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153, 163-168(1983))、電気穿孔法 (エレクトロポレーション法) (Hashimoto, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 336-339(1985))、プロトプラスト法 (Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929-1933(1978)) 等により、酵母を形質転換することができる。形質転換操作後、好ましくは選択マーカー遺伝子の性質に応じて常法により形質転換された酵母を選抜する。得られた酵母は

異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子を含むが、当該遺伝子を含むか否かについては、該酵母からDNAを抽出後、制限酵素を用いて、あるいはPCR法や公知の塩基配列決定法により確認することができる。本発明の酵母としては、本発明の所望の効果の発現の観点から、プロモーターに発現可能に連結された、異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子を含むものが好適である。

【0042】

また、呼吸能が欠損した酵母は公知の方法により容易に得ることができる。酵母は嫌氣的条件でも好氣的条件でも生育が可能であり、前者の場合は細胞質内の解糖系により、後者の場合には、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化により、生育に必要なATPを獲得している。従って、ミトコンドリアDNAの一部あるいは全部を欠失させることによって呼吸能欠損株（ ρ^- ）が得られる（酵母の解剖、柳島直彦、大嶋泰治、大隅正子編、講談社サイエンティフィク、p137~147, 1981年）。なお、ミトコンドリアDNAの全部が欠失した呼吸能欠損株を ρ^0 と表わすことがあるが、本明細書では ρ^- と ρ^0 を総称して ρ^- と表わす。

【0043】

呼吸能を有する酵母（親株 ρ^+ ）から呼吸能欠損株（ ρ^- ）を得る具体的な方法は、たとえば、Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 2000年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000年) に記載されている。すなわち、親株をエチジウムブロマイドを含む培地で培養したのち、炭素源としてグルコースを含む培地では生育できるが、グリセロールを含む培地では生育できない菌株を分離することによって呼吸能欠損株を容易に得ることができる。また、頻度は低いが親株の単一コロニーの中から呼吸能欠損株を得ることができる。

【0044】

以上のような所望の性質を有する本発明の酵母の調製に使用可能な酵母としては、たとえば、Boone, Castenholz 著, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 第2版, Lippincott Williams and Wilkins刊 (2000年) に酵母として記載されている微生物群が挙げられる。酵母の種類は特に限定されるものではない

が、たとえば、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クルイベロマイセス属、ピキア属などの酵母が挙げられる。本発明においては、サッカロミセス属またはシゾサッカロミセス属に属する酵母を使用するのが好ましく、たとえば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) などを使用するのがより好ましい。なお、クルイベロマイセス属に属する酵母としては、たとえば、クルイベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) が、ピキア属に属する酵母としては、たとえば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) が挙げられる。

【0045】

得られた酵母が所望の性質を有する酵母であるか否かは、異種タンパク質の非発現下での生育状態の安定性および／または異種タンパク質の発現下での酵母の生育状態の変化および／または該タンパク質の発現を確認することにより評価することができる。具体的には、たとえば、後述の実施例1に記載の方法により評価することができる。なお、非誘導型のプロモーターを使用した場合には発現と非発現のオン・オフができないことから、かかるプロモーターを使用した酵母の性質評価においては、非発現下にある酵母として異種タンパク質をコードする遺伝子を含まないベクターを用いること以外は本発明の酵母と同様の操作により得られた酵母を用いる。一方、当該酵母は発現誘導型のプロモーターを使用した場合にも非発現下にある酵母として使用可能である。

【0046】

得られた酵母は、それを使用するまでの間、適宜保存することが可能である。保存条件としては、菌体を液体培地に植菌して定常期に達するまで培養した後、培養液を集菌し、その沈殿を10%グリセロール溶液に懸濁したものを-80℃のフリーザーにて保存する、という条件が好適である。

【0047】

本発明の酵母は異種タンパク質を発現するが、その結果、生育状態に変化が生ずるという性質を有する。そのメカニズムについて詳細は未だ不明であるが、該異種タンパク質が酵母の増殖および／または分化に関する調節機構に作用し該変化が生じているものと考えられる。

【0048】

本発明の酵母は、本発明の生理活性物質のスクリーニング方法に使用されるものであるが、以上のような性質を有することから、細胞の増殖や分化に関わる作用因子や、その作用メカニズムについての研究等においても種々の用途が期待される。従って、本発明の一態様として、本発明の酵母からなる、生理活性物質のスクリーニング用試薬、細胞の増殖や分化に関わる作用因子や、その作用メカニズムについての研究用試薬等が提供される。当該試薬は本発明の酵母そのものからなってもよく、所望により任意に他の成分をさらに含ませてもよい。たとえば、前記保存状態にある形態での提供が可能である。

【0049】

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法は、以上のような本発明の酵母を使用するものであるが、具体的には、

- a) 異種タンパク質の発現が可能であり、かつ呼吸能が欠損した酵母と被験試料とを接触させる工程、
- b) 該タンパク質を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに
- c) 酵母の生育状態を測定する工程、

を含むものである。そして、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育が低下もしくは向上する場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。

【0050】

本発明の酵母では、前記するように、発現する異種タンパク質が増殖および／または分化に関する調節機構に作用して生育状態の変化（たとえば、生育の低下もしくは向上）が生ずるものと考えられる。従って、被験試料の存在下に異種タンパク質を発現する酵母を培養した際に、たとえば、当該酵母が異種タンパク質の発現で生育が低下する酵母である場合、被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が向上した時、あるいは当該酵母が異種タンパク質の発現で生育が向上する酵母である場合、被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が低下した時、被験試料中の成分が異種タンパク質等に結合し、該タンパク質等の作用に対し何らかの影響を与えているものと考えられる。たとえば、酵母で発現する異種タンパク質が

Tobの場合、被験試料を存在させることで被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が向上した場合、該被験試料中の成分はTobの機能を阻害する可能性がある。また、たとえば、酵母で発現する異種タンパク質がTobおよびCaf1の両者である場合、Caf1はTobと相互作用してその効果を発揮することが知られていることから、被験試料を存在させることで被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が向上した場合、該被験試料中の成分はCaf1と結合し得、Tob様の作用を発揮する可能性がある。

【0051】

本発明のスクリーニング方法に使用される本発明の酵母には、前記するように、発現誘導型のプロモーターまたは非誘導型のプロモーターを使用可能である。以下においては、説明の簡略化の観点から、発現のオン・オフが可能で、異種タンパク質の発現制御が容易である発現誘導型のプロモーターを使用して得られた酵母を用いる場合について説明する。

【0052】

被験試料としては特に限定されるものではないが、たとえば、化学的に合成された合成化合物、植物や動物の組織から得られた抽出物およびそれらから精製された化合物、微生物や植物・動物細胞の培養液およびそれらから抽出／精製された化合物等が挙げられる。該試料は適宜任意のバッファー等で希釈したものであってもよい。

【0053】

工程 a) において酵母を被験試料と接触させる方法は特に限定されるものではない。たとえば、工程 b) では異種タンパク質を発現する条件下、すなわち、生育状態の変化が生ずる条件下に酵母の培養（本培養）を行うが、本培養前に異種タンパク質等を発現しない条件下、すなわち、生育状態の変化が生じない条件下において該酵母を前培養し、種培養液を得、それを生育状態の変化が生ずる条件下にある培養液に添加して本培養を行う態様（態様 1）では、酵母と被験試料との接触は、たとえば、種培養液を本培養のための培養液に添加する際に同時に被験試料を添加して行うのが好適である。また、本培養において酵母を数分から数時間程度培養した後、異種タンパク質等の発現を制御するプロモーターに応じた

所定の成分を培地に添加して生育状態の変化が生ずる条件とする態様（態様2）では、たとえば、該成分を本培養のための培養液に添加する際に同時に被験試料を添加して酵母と被験試料とを接触させるのが好適である。

【0054】

前培養は、たとえば、酵母の培養に適した公知の培地に、適宜保存されていた酵母を接種して行う。培養は通常の酵母用培養条件、たとえば、24～37℃にて2～3日間、好氣的または嫌氣的条件下で行う。また、培養は、たとえば、フラスコ、試験管等で行えばよい。

【0055】

本培養も前培養と同様の条件で行うことができるが、前記態様1の場合には酵母が生育状態の変化を生ずる条件下にある培地を用いる。たとえば、異種タンパク質をコードする遺伝子がGAL1プロモーターの制御下に連結されている場合には、前培養に使用した培地にガラクトースを添加した培地を用いればよい。また、本培養は、多数の被験試料を同時に試験することができる等の理由から、マイクロタイタープレートのウェル中で行うこともできる。

【0056】

工程c)での酵母の生育状態の測定は、酵母の培養過程における菌体の増殖の程度の指標となる任意のパラメータを測定することにより行なう。酵母の生育状態の測定は、具体的には、たとえば、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより行うのが好ましいが、これらの方法に限定されるものではない。酵母培養液の濁度変化は、本培養の際に培養液の濁度を、たとえば、分光光度計により経時的に測定することによりモニターすることができる。同様に、酵母の形態変化は、たとえば、光学顕微鏡により経時的に酵母の形態を観察することによりモニターすることができる。酵母の湿重量変化は培養液を経時的に回収して集菌（たとえば、3,000rpmで10分間の遠心分離による）し、その重量を測定することにより、また、酵母の乾燥重量変化は集菌した酵母を乾燥（たとえば、105℃で4時間の維持による）後、その重量を測定することにより、それぞれモニターすることができる。酵母の内因性酵素活

性変化のモニターは、たとえば、インペルターゼ、ヘキソキナーゼの活性を常法により経時的に測定することにより行うことができる。また、酵母の内因性タンパク質量変化のモニターは、生育段階によって発現量が変化しないタンパク質の量的変化をモニターすることが好ましく、たとえば、アクチンやURA3の量を当該タンパク質に特異的な抗体によるウェスタンブロッティングにより経時的に測定することにより行うことができる。なお、本発明の酵母の生育状態の変化は種々の原因により培養途中で外れる場合があるため、モニターは10～300時間行うのが好適であり、80～200時間行うのがより好適である。

【0057】

一方、対照として、工程 a) で酵母と被験試料とを接触させないこと以外は同様の操作を行い、同様に酵母の生育状態の測定を行う。

【0058】

次いで、得られた結果に基づき、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の低下もしくは向上が認められるか否かについて評価する。評価は、得られた酵母の生育状態の測定結果を時間に対してプロットすることにより酵母の増殖曲線を得、被験試料と接触させた場合に得られた酵母の増殖曲線と対照の増殖曲線とを対比することにより行うのが好適である。具体的には、被験試料の存在下および非存在下での酵母の増殖曲線を得、それぞれ世代時間を求め、それらを対比し、被験試料の非存在下に比べて存在下に酵母の世代時間が長くなる場合、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の低下が認められた、と評価する。一方、被験試料の非存在下に比べて存在下に酵母の世代時間が短くなる場合、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の向上が認められた、と評価する。また、世代時間の代わりに増殖速度を求めてもよい。この場合、増殖速度が遅くなった場合に、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の低下が認められた、と評価する。また、増殖速度が速くなった場合に、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の向上が認められた、と評価する。なお、酵母の生育状態の測定を酵母の形態変化をモニターすることにより行った場合は、形態変化を起こした細胞数をヘマトメーター等でカウントし、それを酵母の培養時間に

対してプロットすることにより増殖曲線を得る。

【0059】

以上の結果、被験試料の存在下に酵母の生育の低下もしくは向上が認められた場合、被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。当該生理活性物質は、異種タンパク質の発現に伴う本発明の酵母の生育状態の変化に対し何らかの影響を及ぼしうる、たとえば、当該変化を相殺しうるような活性を有することから、該活性を指標として、さらに、所望により、たとえば、遠心分離、ろ過、液-液分配、吸着／溶出、クロマトグラフ、再結晶等を組み合わせ、公知の精製方法に従って該物質を単離することができる。

【0060】

また、本発明は前記スクリーニング方法により得られうる生理活性物質を提供する。該生理活性物質は少なくともスクリーニング過程で使用する異種タンパク質の機能に関連した生理活性を有する。たとえば、異種タンパク質がシグナルタンパク質であった場合、該生理活性物質は細胞周期の制御機構に作用しうると考えられることから、たとえば、細胞周期の制御機構の解明等の研究や、細胞周期の制御機構の異常が発症や病態進行の原因のうちの少なくとも1つとなっている疾患等の治療または予防への使用が期待される。たとえば、Tobの機能を阻害する物質は骨粗鬆症や骨折などの骨疾患の治療剤となる可能性があり、Caf1と相互作用してTobと同様の作用を発揮する物質は抗癌剤となる可能性がある。

【0061】

該スクリーニング方法により、生理活性物質として、たとえば、チロシンキナーゼ阻害剤が得られうるが、かかる物質はタンパク質のチロシン残基のリン酸化を阻害するという機能を有しており、該阻害剤は、たとえば、チロシンキナーゼがかかわる過剰な細胞内シグナル伝達が病態の悪化の原因となっている疾患の治療薬、より具体的には制癌剤などとして使用されうる。

【0062】

本発明の生理活性物質を医薬製剤とする場合には、たとえば、経口または非経口投与に適した公知の有機または無機の担体、賦形剤、その他の添加剤を用いて常法に従って経口または非経口投与の固体状、半固体状または液状の製剤として

調製できる。生理活性物質の投与量は、各物質の性質に応じ、所望の効果が得られうるように適宜調整すればよい。また、該製剤における生理活性物質の含有量は、その使用方法に応じて生理活性物質の所定量が投与できるようであれば特に限定されるものではない。

【0063】

さらに、本発明の一態様として、本発明の酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キットを提供する。当該キットは本発明の生理活性物質のスクリーニング方法に好適に用いることができる。キットには、所望により、任意の培地、酵母の生育状態の測定に使用される種々の試薬（たとえば、タンパク質定量用試薬、形質転換用のプラスミドベクター、宿主の酵母、Tob等の特異抗体、酵素活性定量試薬等）、および本発明の生理活性物質のスクリーニング方法を実施するための説明書等を含めてもよい。

【0064】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

【0065】

実施例において使用した菌株、培地、試薬、ならびに一般的な実験方法を、以下にまとめて示す。

【0066】

1. 菌株

使用した菌株を表1に示す。

【0067】

【表1】

菌	株	遺伝子型
<i>E.coli</i>	JM109	<i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15], <i>e14</i> (<i>McrA</i>)
<i>S.cerevisiae</i>	YPH500-12	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp-Δ63</i> , <i>his3-1Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , ρ^0 (あるいは ρ^-)

【0068】

2. 培地および試薬

各培地および各試薬の組成については、Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 2000年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000年) を参照のこと。培地は全てオートクレーブして用いた。

【0069】

3. 実験方法

(1) 大腸菌JM109の形質転換

-80℃で保存してあるJM109のコンピテント細胞100 μ lを氷上で溶解し、5 μ lのプラスミドDNAを加えて氷上で30分間静置した。42℃、30秒間ヒートショックを行った後氷上で2分間静置し、SOC培地を0.9ml加えてよく混合し、37℃で45分間培養した。それをAmp濃度100 μ g/mlのLB+Amp固形培地にまき、37℃で一夜培養した。

【0070】

(2) プラスミドDNAの中量調製法 (中量抽出)

30ml LB+Amp液体培地で培養した菌体を遠心用チューブに移して室温で8000rpm、5分間遠心することによって集菌した。沈殿物に3mlのリゾチーム溶液 (5mg リゾチーム/1ml グルコースバッファー) を添加、緩やかに溶解した後、氷上に5分間静置した。4mlのNaOH-SDS溶液 (0.2N NaOH-1% SDS) を加えて緩やかに混合

し、氷上に5分間静置した。3mlの3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.8) を加え、緩やかに混合し、氷上に10分間静置した後、15,000rpm、15分間、4℃で遠心を行った。上清を新しいチューブに移し、6mlのイソプロパノールを加えて-20℃に20分間静置した後、15,000rpm、15分間、4℃で遠心を行った。沈殿を2mlの70%エタノールで洗浄した後、300 μ lのTEに溶解してエッペンドルフ (登録商標) チューブに移し、同じく300 μ lのTEで遠心チューブを洗浄してエッペンドルフ (登録商標) チューブに移した (計600 μ l)。6 μ lの10mg/ml RNaseを加えて37℃で20分間インキュベートした後、フェノール抽出を3回、クロロホルム抽出を3回、エーテル抽出を3回行った。120 μ lの5M NaCl溶液と240 μ lの30% PEG# 6000を加えて混合した後-20℃で40分間静置し、4℃で30分間静置した。14,000rpm、10分間、4℃で遠心した後、沈殿を回収してチューブの中の水分を完全に取り除き、80 μ lの滅菌水に溶解した。4.8 μ lの5M NaCl溶液と192 μ lのエタノールを加えて混合し、-20℃で30分間静置した。14,000rpm、15分間、4℃で遠心した後、沈殿に200 μ lの70%エタノールを加えて緩やかに沈殿を洗った。14,000rpm、15分間、4℃で遠心した後沈殿を吸引ポンプで乾燥し、100 μ lのTEに溶解した。その後、OD₂₆₀値および電気泳動によって濃度を測定した。

【0071】

(3) PCR法

98℃・30秒間、60℃・60秒間、72℃・90秒間のサイクルを25サイクルという条件で行った。5ng/ μ lのサンプルDNA 10 μ lに対し50 μ Mのプライマーをそれぞれ5 μ lずつ、NEB×10バッファを10 μ l、4mM 4dNTPミックスを10 μ l、NEB Vent pol (2U/ μ l)を0.5 μ l、滅菌水を59.5 μ l加えて計100 μ lに調整し、それに10mg/mlのBSAを1 μ l、ミネラルオイルを60 μ l加えて反応を行った。

【0072】

(4) アガロースゲルの切り出しによるDNAの単離

中量抽出によって調製したプラスミドDNA 5 μ g分を100 μ lの系で制限酵素で処理後、Loading Dye 20 μ lを加えて120 μ lとした。電気泳動装置「ミュービッド (登録商標)」 (株式会社アドバンス製) の6mmの幅のコーム3つを1つになるようにセロファンテープで巻き、0.7%のアガロースゲルを作製した。120 μ lのサ

ンプルをゲルにアプライして泳動を行い、泳動終了後365nm長波長DNA切り出し用ランプをゲルにあてながらカッターナイフを用いて目的のバンドを切り出した。回収したゲルを250 μ lの0.5 \times TBE入りの透析チューブに入れ、それをミューピッドにセットして通常の方に泳動を30分間行い、その後逆方向に泳動を30秒間行った。0.5 \times TBEを回収してフェノール抽出を2回、エーテル抽出を3回行った。

【0073】

(5) プラスミドDNAの小スケール調製法 (ミニプレップ)

エッペンドルフ (登録商標) チューブに入った1.2ml LB+Amp液体培地に形質転換した大腸菌のコロニーを接種し、37 $^{\circ}$ C、一夜培養した。培養液を室温で12,000rpm、1分間遠心した後、100 μ lのグルコースバッファーを加えてボルテックスし、沈殿を完全に懸濁した。150 μ lのNaOH-SDS溶液(0.2N NaOH-1% SDS)を加え、チューブを上下に振って穏やかに混ぜた後、氷中に5分間静置した。150 μ lの3M酢酸カリウムバッファーを加えて混合した後、500 μ lのフェノールを加えて混合し、4 $^{\circ}$ Cで12,000rpm、5分間の遠心を行なった。上層(約500 μ l回収)を別のチューブに移し、等量(500 μ l)のクロロホルムを加えて4 $^{\circ}$ Cで12,000rpm、5分間の遠心を行なった。上層(約400 μ l回収)を別のチューブに移し、二倍量(800 μ l)のエタノールを加えてよく混ぜ、-20 $^{\circ}$ Cで30分間静置した後、4 $^{\circ}$ C、14,000rpm、10分間の遠心を行い、沈殿に200 μ lの70%エタノールを加えて軽く混合した。4 $^{\circ}$ C、14,000rpm、5分間の遠心を行い、沈殿を吸引ポンプで乾燥させた後、20 μ lのRNase入りTE(10mg/ml RNase 1 μ l-TE 20 μ l)に溶解し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その後、取得したプラスミドDNAを制限酵素で処理し、電気泳動による確認を行なった。

【0074】

(6) 酵母の形質転換 (酢酸リチウム法)

5mlのYPD液体培地に酵母を植菌し、30 $^{\circ}$ C、一夜の前培養を行なった。培養液のうちの1mlを20mlのYPD液体培地に植菌し、30 $^{\circ}$ Cで4~6時間、KU (Klett unit) 値が60前後になるまで培養した。培養液のOD₆₀₀値を測定し、測定値から菌体数が 2×10^8 cellsになるように培養液の量を計算して計りとり、50mlの遠心チューブに移した。室温で3,000rpm、5分間の遠心を行なった後、沈殿を10mlのTEに懸濁し、同

様に室温で3,000rpm、5分間の遠心を行った。沈殿を1mlのTEに懸濁して1mlの0.2 M 酢酸リチウム溶液を加え、30℃で1時間培養した（コンピテント細胞作製終了）。作製したコンピテント細胞を200 μ lずつ1.5mlのチューブに分注し、それぞれ5 μ g分のDNAを加え、氷上で30分間静置した。200 μ lの70% PEG4000を加えてよく混合し、30℃で1時間インキュベートした後、42℃で5分間のヒートショックを行った。その後すぐに4℃、12,000rpm、5分間の遠心を行い、沈殿を前もって氷上で冷やしておいた1mlの滅菌水に懸濁した。4℃、12,000rpm、5分間の遠心を行い、沈殿を冷却した100 μ lの滅菌水に懸濁した後、CSM-TRP固形培地にまき、30℃で3～5日間培養した。なお、KU値は、Klett Summerson光電光度計（Klett Manufacturing社製）により測定した。

【0075】

（7）SDS-PAGE-ウエスタンブロッティング

①タンパク質の調製（アルカリ-TCA-SDS法）

5mlの培養液をエッペンドルフ（登録商標）チューブに移して14,000rpm、5分間遠心することによって集菌し、それを2、3回繰り返した。沈殿を1.25mlの滅菌水に懸濁し、160 μ lのMe-NaOHを加えて氷上に10分間静置した。14,000rpm、20分間遠心後、上清をピペットマンを用いて完全に除去し、沈殿に1.5mlの冷アセトンを加え、ボルテックスおよび超音波処理で菌体を完全懸濁にした。氷上に10分間静置した後、14,000rpm、5分間遠心して沈殿を回収し、エッペンドルフチューブのふたを開けてしばらく室温に静置し、アセトンをとばした（アセトン洗浄）。アセトン洗浄をもう一度行った後、沈殿を150 μ lの1% SDS/0.1M Tris-HCl バッファー（pH6.8）に溶解し、pH試験紙でpHが中性かアルカリ性であることを確認した後、超音波処理で沈殿を溶解した。95℃、3分間加熱した後、14,000rpm、5分間遠心して上清を回収し、Lowry法を用いてタンパク質の量を測定した。

【0076】

②Lowry法

本法については、「Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275」に記載されている。はじめにBSA（ウシ血清アルブミン）を用いて標準曲線を作成した。BSAを10, 20, 30, 40, 50,

70, 90, 110, 130 $\mu\text{g}/200\mu\text{l}$ になるようにそれぞれ調整し、そのサンプルに1mlのC液を入れてボルテックスし、室温に10分間静置した。0.1mlのLowry試薬を加え、ボルテックス、室温で30分間静置した後、OD₇₅₀とOD₅₀₀の値を測定し、得られた値から標準曲線を作成した。同様にして目的サンプルのOD₇₅₀とOD₅₀₀の値を測定し、標準曲線に照らし合わせてタンパク質の量を決定した。

【0077】

③ゲルの作製、準備および電気泳動

本法の実施には電気泳動装置MODEL BE-230 (BIO CRAFT社製) を用いた。分離ゲルは7%と10%のものをそれぞれ用いた。ガラス平板、ガラスプレート、パッドを70%エタノールできれいにふき取った後、それらをクリップでとめ、分離ゲルに10% APS (Ammonium Peroxodisulfate) を加えてプレートに流し込み、その上に1mlの滅菌水を流し込んだ。室温で30分間静置した後、滅菌水を捨てて残った水分をろ紙を用いて取り除いた後、濃縮ゲルに10% APSを加えてプレートに流し込み、コームを差し込んで室温で30分間静置した。分離ゲルおよび濃縮ゲルの組成はLaemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685, 1970もしくは新生化学実験講座1. タンパク質I 分離・精製・性質, 日本生化学会 編, 東京化学同人 (1997) に記載されている。

【0078】

作製したゲルのコームをはずし、小さい薬さじで残ったゲルをかきとり、コームの穴に残ったゲルを蒸留水で洗った。パッドをはずし、クリップで泳動層の上層と一緒に両端をとめ、泳動層の下層に泳動バッファーを入れて上層を下層にはめた。上層に新しい泳動バッファーを入れ、マーカーとサンプルをアプライした後、コードを接続して30mAの電流で泳動を行った。泳動終了後、クリップをはずして分離ゲルのみを回収してタッパーに移した。

【0079】

④ウエスタンブロッティング

Electro blottingバッファーにひたしたゲルと同じ大きさのろ紙6枚とニトロセルロース膜をウエスタンブロッティング用の電極板にろ紙3枚、ゲル、ニトロセルロース膜、ろ紙3枚の順に重ね、100mAで1時間、電流を流した。電流を流し

終わった後、ニトロセルロース膜をプラスチックケースに移し、TPBS中で一時間振とうし（20分おきに液を交換）、5mlのTPBSに5 μ lの一次抗体を加えて一時間振とうした。TPBSで30分間振とうした後（10分おきに液を交換）、5mlのTPBSに5 μ lの2次抗体を加え、1時間振とうした。PBSで30分間振とうした後（10分おきに液を交換）、6mgの4-クロロ-1-ナフトールを2mlのメタノールに溶解し、10mlのPBSと5 μ lのH₂O₂を加えたものにニトロセルロース膜を入れ、手で振とうして発光させた。滅菌水で15～30分間振とうした後、ろ紙とアルミホイルに包んで保存した。

【0080】

（8）酵母の呼吸能欠損株（ ρ^- ）の取得

5mlの25 μ g/ml エチジウムブロマイド（EtBr）添加SD培地（0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acid+2% Glucose）に酵母親株（ ρ^+ ）を植菌し、full growthまで30℃で3日間培養した。その培養液から0.1mlにとって新しいEtBr添加SD培地に植え継ぎ、full growthまで30℃で3日間培養した後、滅菌水で希釈してYPDプレートに塗布接種し、30℃で3日間培養した。得られたシングルコロニーをYPDプレートとYPグリセロールプレートに植え継ぎ、呼吸能欠損株（ ρ^- ）の取得を確認した。

【0081】

実施例1 酵母Saccharomyces cerevisiaeの呼吸能欠損株におけるtob（htob）遺伝子の発現

本実施例ではtob（htob）遺伝子を酵母Saccharomyces cerevisiae YPH500-1 2株（ ρ^- ）に導入することにより菌体内においてTobタンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、tob遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

【0082】

なお、ベクターとしてpESC-TRPをサブクローニングに使用した。また、tob遺伝子は、該遺伝子を含むpME18S-tob（pME18SのEcoRI部位にtob遺伝子を挿入したもの）のものを増幅して用いた。

【0083】

(1) pESC-TRP- tobの作製

pME18S-tobを用いて大腸菌JM109の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミドDNAの調製（中量抽出）を行った。同様にpESC-TRPについても大腸菌の形質転換を行い、プラスミドDNAの調製（中量抽出）を行った。調製したプラスミドpME18S-tobをテンプレートとし、

フォワードプライマー:

5'-cccggatcca tgcagcttga aatccaagta-3' (配列番号: 5)

リバースプライマー:

5'-cccgtcgacg ttagccataa caggctggaa-3' (配列番号: 6)

を用いてPCRを行い、tob遺伝子を増幅した。得られたPCR産物をBamHIとSalIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNAを回収した。pESC-TRPについてもBamHIとSalIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNAを回収した。これらの実験操作によって回収したtob遺伝子とpESC-TRPの断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミドDNAの調製（中量抽出）を行った。

【0084】

(2) YPH500-12株 (ρ^-) におけるTobタンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法によりYPH500-12株 (ρ^-) の形質転換を行った。得られた形質転換体を別のCSM-TRP固形培地に植え継いで30℃で2~3日間培養し、それによってトリプトファン要求性を持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから5mlのCSM-TRP Glc (2%) 培地にコロニーを植菌して前々培養を行った。前々培養を30℃で162時間行った時点で培養液から0.1mlとって5mlのCSM-TRP Raf (2%) 培地に植え継ぎ、さらに前培養を122時間行った後、培養液から0.1mlとって2本ずつの5mlのCSM-TRP Raf (2%) 培地とCSM-TRP Raf (2%) + Gal (2%) 培地にそれぞれ植え継ぎ、生育を観察した。ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収を69時間培養時点で行った。10%のアクリルアミドゲルを用いて50 μ g分のタンパク質を泳動し、次いでニトロセルロース膜に転写した。Tobタンパク質の検出にはmyc抗体を用いた。myc抗体とはTobタンパク質のC末

端に付与したmycタグに対する特異的抗体である。

【0085】

(3) Tobタンパク質の発現によるYPH500-12株 (ρ^-) の生育の低下の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターであるpESCベクターはGAL1プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。そこで、ガラクトースの存在下に形質転換酵母を培養しTobタンパク質の発現を誘導した。

【0086】

YPH500-12株 (ρ^-) について培養時間に対してKU値をプロットし増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を図1に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を図2に示す。

【0087】

なお、本明細書において図中、各プラスミド名は当該プラスミドにより形質転換した酵母の結果であることを示し、各プラスミド名における数字は当該プラスミドを用いて得られた別個の形質転換酵母であることを示す。

【0088】

図1より、Tobタンパク質の非発現下 (Raf) および発現下 (Raf+Gal) で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、Tobタンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pESC-TRP-tob-19、22、23 (Raf) に比べpESC-TRP-tob-19、22、23 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pESC-TRP-tob-19、22、23 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、図2に示すように、Tobタンパク質の発現条件下にある酵母では発現したTobタンパク質が捉えられた。

【0089】

実施例2 酵母 *S. cerevisiae* の呼吸能欠損株におけるcaf (hcafl) 遺伝子の発現

本実施例ではcaf (hcafl) 遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* YPH500-12株 (ρ^-) に導入することにより菌体内においてCafタンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、hcafl遺伝子導

入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

【0090】

なお、ベクターとしてpESC-URAをサブクローニングに使用した。また、hcafl遺伝子は、該遺伝子を含むpcDNA3-hcafl (pcDNA3のBamHI-XhoI部位にhcafl-myc遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

【0091】

(1) pESC-URA-hcaflの作製

pcDNA3-hcaflを用いて大腸菌JM109の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミドDNAの調製(中量抽出)を行った。同様にpESC-URAについても大腸菌の形質転換を行い、プラスミドDNAの調製(中量抽出)を行った。調製したプラスミドpcDNA3-hcaflをBamHIとXhoIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNAを回収した。pESC-URAについてもBamHIとXhoIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNAを回収した。これらの実験操作によって回収したhcafl遺伝子とpESC-URAの断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミドDNAの調製(中量抽出)を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。

【0092】

(2) YPH500-12株(ρ^-)におけるCafタンパク質の発現および生育実験

実施例1と同様にしてCafタンパク質の発現および生育実験を行った。なお、培地はCSM-URA培地を使用した。また、ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収は45時間培養時点で行った。

【0093】

(3) Cafタンパク質の発現によるYPH500-12株(ρ^-)の生育の低下の解析

実施例1と同様にしてYPH500-12株(ρ^-)の増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を図3に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を図4に示す。

【0094】

図3より、Cafタンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概して

バラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、Cafタンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pESC-URA-hcaf1-13、14、15、16 (Raf) に比べpESC-URA-hcaf1-13、14、15、16 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pESC-URA-hcaf1-13、14、15、16 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、図4に示すように、Cafタンパク質の発現条件下にある酵母では発現したCafタンパク質が捉えられた。

【0095】

実施例3 酵母 *S. cerevisiae* の呼吸能欠損株における tob 遺伝子と hcaf1 遺伝子の同時発現

本実施例では tob (htob) 遺伝子と caf (hcaf1) 遺伝子とを酵母 *S. cerevisiae*

YPH500-12株 (ρ^-) に同時に導入することにより菌体内においてTobタンパク質とCafタンパク質とを共に発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、以前構築した tob 遺伝子導入用プラスミドと hcaf1 遺伝子導入用プラスミドとを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

【0096】

(2) YPH500-12株 (ρ^-) におけるTobタンパク質とCafタンパク質の発現および生育実験

YPH500-12株 (ρ^-) を pESC-TRP-tob と pESC-URA-hcaf1 で同時に形質転換すること以外は実施例1と同様にしてTobタンパク質とCafタンパク質の同時発現および生育実験を行った。なお、ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収は144時間培養時点で行った。

【0097】

(3) Tobタンパク質とCafタンパク質の同時発現によるYPH500-12株 (ρ^-) の生育の低下の解析

実施例1と同様にしてYPH500-12株 (ρ^-) の増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を図5に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を図6に示す。なお、図中、pESC-TRP-tobをpTtobと、pESC-URA-hcaf1をpUhcaf1と、略して記載する

【0098】

図5より、前記両タンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、両タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pTtob+pUhcafl-13、15、16、17 (Raf) に比べpTtob+pUhcafl-13、15、16、17 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pTtob+pUhcafl-13、15、16、17 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、Tobタンパク質とCafタンパク質を酵母において同時に発現させた場合、それらを各々単独で発現させる場合よりも酵母の生育の低下が増大することが分かる。図6に示すように、両タンパク質の発現条件下にある酵母では発現したTobタンパク質とCafタンパク質が捉えられた。

【0099】

実施例4 酵母*S. cerevisiae*の呼吸能欠損株におけるlck遺伝子の発現

本実施例ではlck遺伝子を酵母*S. cerevisiae* YPH500-12株 (ρ^-) に導入することにより菌体内においてLckタンパク質 (チロシンキナーゼ) を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、lck遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

【0100】

なお、ベクターとしてpESC-URAをサブクローニングに使用した。また、lck遺伝子は、該遺伝子を含むpME18SH-lck (pME18SH [pME18Sの元のHindIII部位をつぶして、その後EcoRI部位をHindIII部位に改変したベクター] のHindIII部位にlck遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

のものを増幅して用いた。

【0101】

(1) pU1ckの作製

pME18SH-lckを用いて大腸菌JM109の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミドDNAの調製 (中量抽出) を行った。同様にpESC-URAについても大腸菌

の形質転換を行い、プラスミドDNAの調製（中量抽出）を行った。調製したpME18 SH-lckをテンプレートとし、

フォワードプライマー：

5'-atgggctgtg gctgcagctc a-3' （配列番号：7）

リバープライマー：

5'-cccgctcgaca ggctgaggct ggtactggcc-3' （配列番号：8）

を用いてPCRを行い、lck遺伝子を増幅した。得られたPCR産物をSalIで処理した後、kinaseによって末端のリン酸化を行い、その後ゲルからの切り出しによってDNAを回収した。pESC-URAをBamHIで処理した後、Klenow酵素によって末端の平滑化を行った。それをSalIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNAを回収した。これらの実験操作によって回収したlck遺伝子とpESC-URAの断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミドDNAの調製（中量抽出）を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。

【0102】

（2）YPH500-12株（ ρ^- ）におけるLckタンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法によりYPH500-12株（ ρ^- ）の形質転換を行った。得られた形質転換体を別のCSM-URA固形培地に植え継いで30℃で2～3日間培養し、それによってウラシル要求性を持たない形質転換体を選抜した。そのプレートから5mlのCSM-URA Raf（2%）培地にコロニーを植菌し、前培養を30℃で96時間行った後、培養液から0.1mlとって2本ずつの5mlのCSM-URA Raf（2%）培地とCSM-URA Raf（2%）+Gal（2%）培地にそれぞれ植え継ぎ、生育を観察した。ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収を47時間培養時点で行った。7.5%のアクリルアミドゲルを用いて50 μ g分のタンパク質を泳動し、次いでニトロセルロース膜に転写した。Lckタンパク質の検出にはmyc抗体を用いた。

【0103】

（3）Lckタンパク質の発現によるYPH500-12株（ ρ^- ）の生育の低下の解析

実施例1と同様にしてYPH500-12株（ ρ^- ）の増殖曲線を作成した。当該増殖

曲線を図7に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を図8に示す。

【0104】

図7より、Lckタンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、Lckタンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pUICK -2、3、4 (Raf) に比べpUICK -2、3、4 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pUICK -2、3、4 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、図8に示すように、Lckタンパク質の発現条件下にある酵母では発現したLckタンパク質が捉えられた。

【0105】

配列表フリーテキスト

配列番号: 5 は、tob遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

【0106】

配列番号: 6 は、tob遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

【0107】

配列番号: 7 は、lck遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

【0108】

配列番号: 8 は、lck遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

【0109】

【発明の効果】

本発明により、生理活性物質を効率的にスクリーニングすることができる生理活性物質のスクリーニング方法が提供される。当該方法により得られる生理活性物質は、たとえば、ホ乳類のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する。従って、当該生理活性物質は細胞の増殖や分化が関与する種々の疾患の治療剤および／または予防剤となる可能性がある。また、当該方法に使用される、異種タンパク質を発現可能な呼吸能を欠損した酵母は、当該タンパク質の非発現下と比べて発現下で生育状態が変化し、異種タンパク質を発現可能な呼吸能を有する酵母に比べ、前記変

化はより鋭敏であり、しかも、異種タンパク質の非発現下においてはより安定した生育を示す、という性質を有する。当該性質は、前記方法において、生理活性物質のスクリーニングの効率化に大きく寄与する。

【0 1 1 0】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Biochemical and Pharmacological Laboratories Inc.

<120> A screening method

<130> M-14-014

<160> 8

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Glu Ile Gln Val Ala Leu Asn Phe Ile Ile Ser Tyr Leu

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Leu Pro Arg Arg Arg Val Asn Ile Phe Gly Glu Glu Leu

20 25 30

Glu Arg Leu Leu Lys Lys Lys Tyr Glu Gly His Trp Tyr Pro Glu Lys

35 40 45

Pro Tyr Lys Gly Ser Gly Phe Arg Cys Ile His Ile Gly Glu Lys Val
50 55 60

Asp Pro Val Ile Glu Gln Ala Ser Lys Glu Ser Gly Leu Asp Ile Asp
65 70 75 80

Asp Val Arg Gly Asn Leu Pro Gln Asp Leu Ser Val Trp Ile Asp Pro
85 90 95

Phe Glu Val Ser Tyr Gln Ile Gly Glu Lys Gly Pro Val Lys Val Leu
100 105 110

Tyr Val Asp Asp Asn Asn Glu Asn Gly Cys Glu Leu Asp Lys Glu Ile
115 120 125

Lys Asn Ser Phe Asn Pro Glu Ala Gln Val
130 135

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Glu Gly His Trp Tyr Pro Glu Lys Pro Tyr Lys Gly Ser Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Ile

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Pro Gln Asp Leu Ser Val Trp Ile Asp Pro Phe Glu Val Ser Tyr

1

5

10

15

Gln Ile Gly Glu Lys

20

<210> 4

<211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Ala Glu Thr Val Asp His Ser Gln Arg Ile Cys Glu Val Trp

1

5

10

15

Ala Cys Asn Leu Asp Glu Glu Met Lys Lys Ile Arg Gln Val Ile Arg

20

25

30

Lys Tyr Asn Tyr Val Ala Met Asp Thr Glu Phe Pro Gly Val Val Ala

35

40

45

Arg Pro Ile Gly Glu Phe Arg Ser Asn Ala Asp Tyr Gln Tyr Gln Leu

50

55

60

Leu Arg Cys Asn Val Asp Leu Leu Lys Ile Ile Gln Leu Gly Leu Thr

65

70

75

80

Phe Met Asn Glu Gln Gly Glu Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Thr Trp Gln

85

90

95

Phe Asn Phe Lys Phe Asn Leu Thr Glu Asp Met Tyr Ala Gln Asp Ser

100

105

110

Ile Glu Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ile Gln Phe Lys Lys His Glu Glu

115

120

125

Glu Gly Ile Glu Thr Gln Tyr Phe Ala Glu Leu Leu Met Thr Ser Gly

130

135

140

Val Val Leu Cys Glu Gly Val Lys Trp Leu Ser Phe His Ser Gly Tyr

145

150

155

160

Asp Phe Gly Tyr Leu Ile Lys Ile Leu Thr Asn Ser Asn Leu Pro Glu

165

170

175

Glu Glu Leu Asp Phe Phe Glu Ile Leu Arg Leu Phe Phe Pro Val Ile

180

185

190

Tyr Asp Val Lys Tyr Leu Met Lys Ser Cys Lys Asn Leu Lys Gly Gly
195 200 205

Leu Gln Glu Val Ala Glu Gln Leu Glu Leu Glu Arg Ile Gly Pro Gln
210 215 220

His Gln Ala Gly Ser Asp Ser Leu Leu Thr Gly Met Ala Phe Phe Lys
225 230 235 240

Met Arg Glu Met Phe Phe Glu Asp His Ile Asp Asp Ala Lys Tyr Cys
245 250 255

Gly His Leu Tyr Gly Leu Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Gln Asn Gly
260 265 270

Thr Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Glu Ala Asn Lys Gln Ser
275 280

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify tob gene

<400> 5

cccggatcca tgcagcttga aatccaagta

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify tob gene

<400> 6

cccgctgacg ttagccataa caggctggaa

30

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify lck gene

<400> 7

atgggctgtg gctgcagctc a

21

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify lck gene

<400> 8

cccgtcgaca ggctgaggct ggtactggcc

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、tob 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 2】

図 2 は、69 時間培養した時点での tob 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 3】

図 3 は、hcafl 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 4】

図 4 は、45 時間培養した時点での hcafl 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 5】

図 5 は、tob 遺伝子と hcafl 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 6】

図 6 は、144 時間培養した時点での tob 遺伝子と hcafl 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 7】

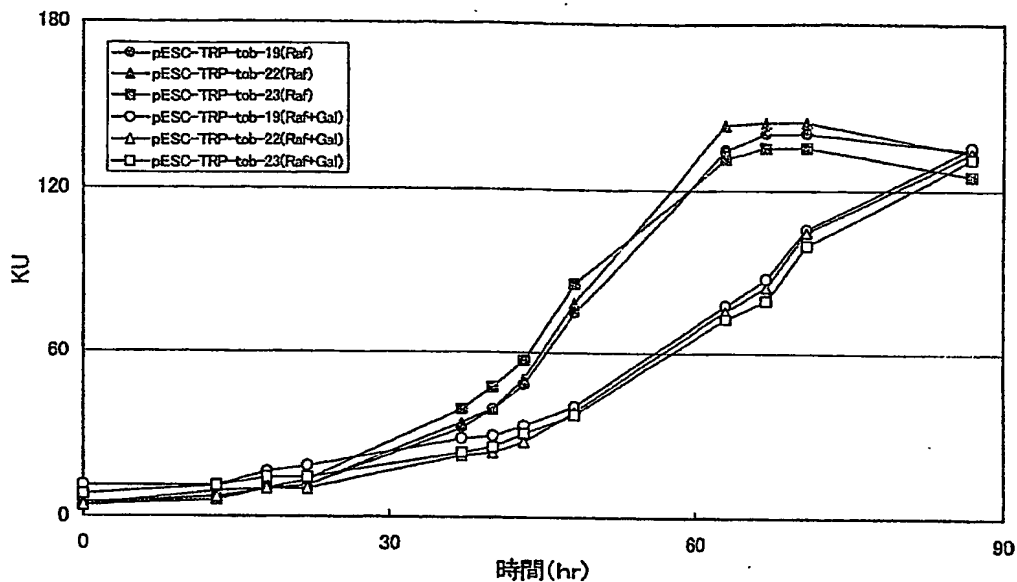
図 7 は、lck 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 8】

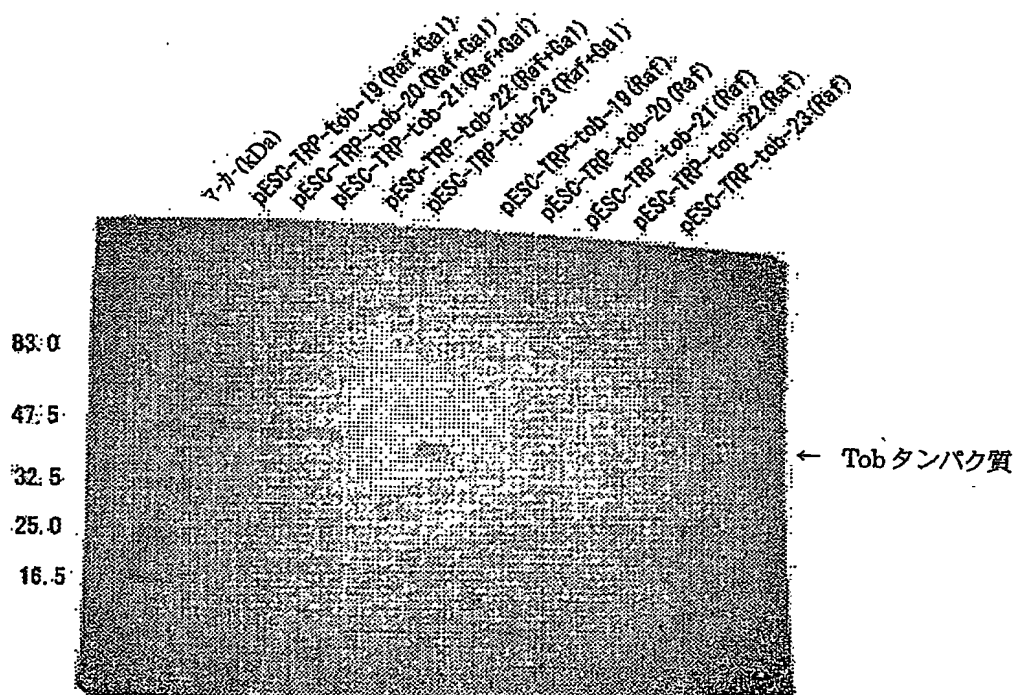
図 8 は、47 時間培養した時点での lck 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

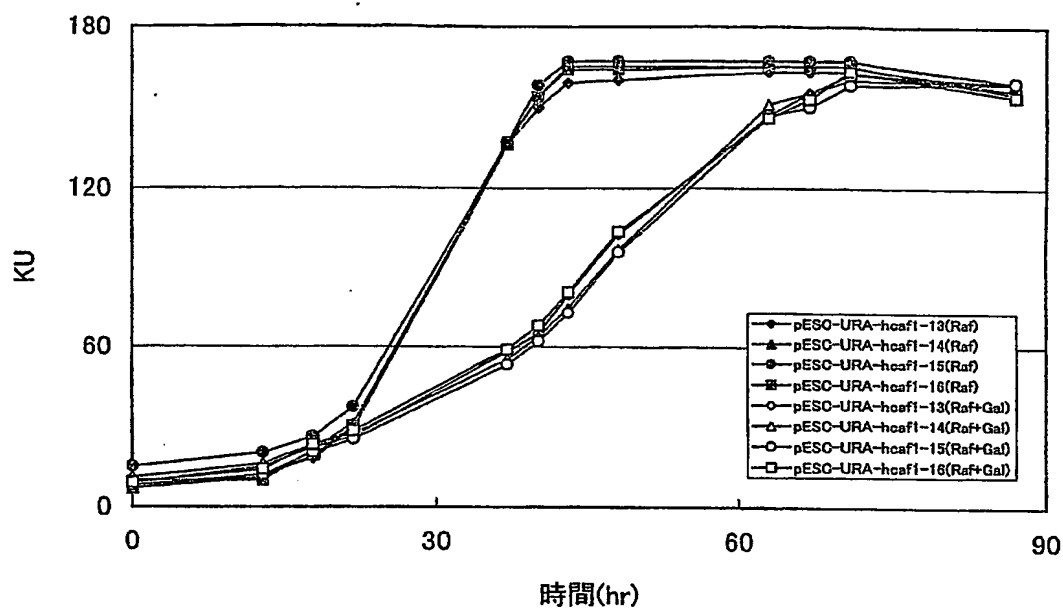


【図 2】

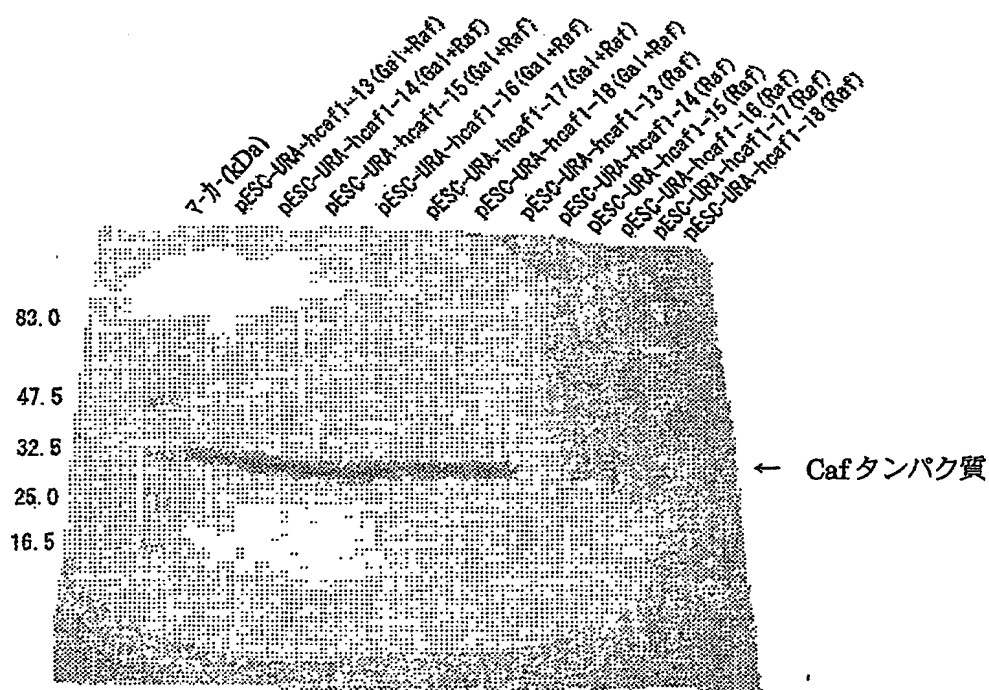


BEST AVAILABLE COPY

【図 3】

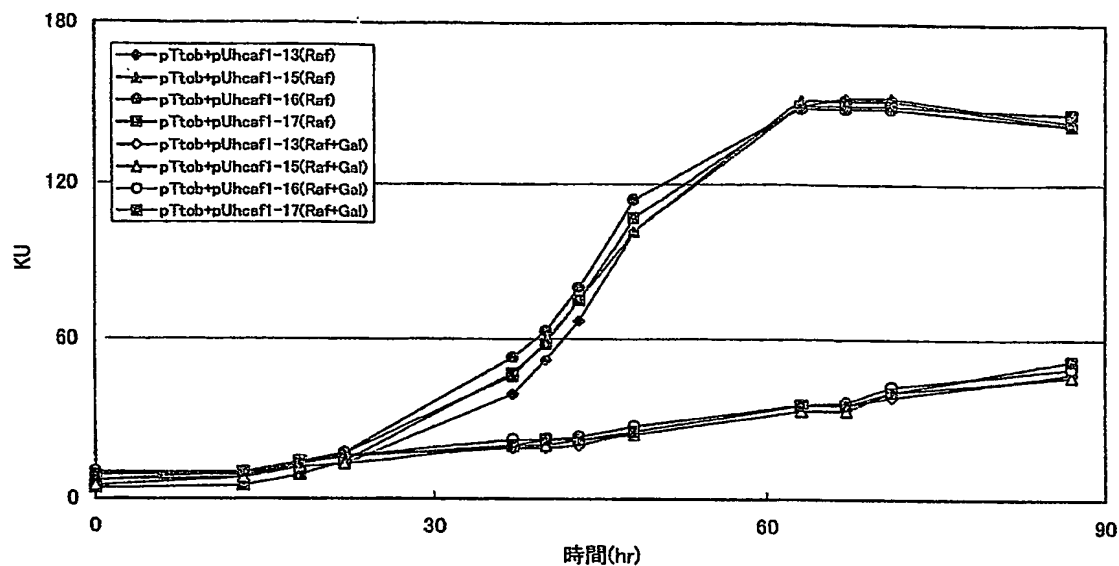


【図 4】

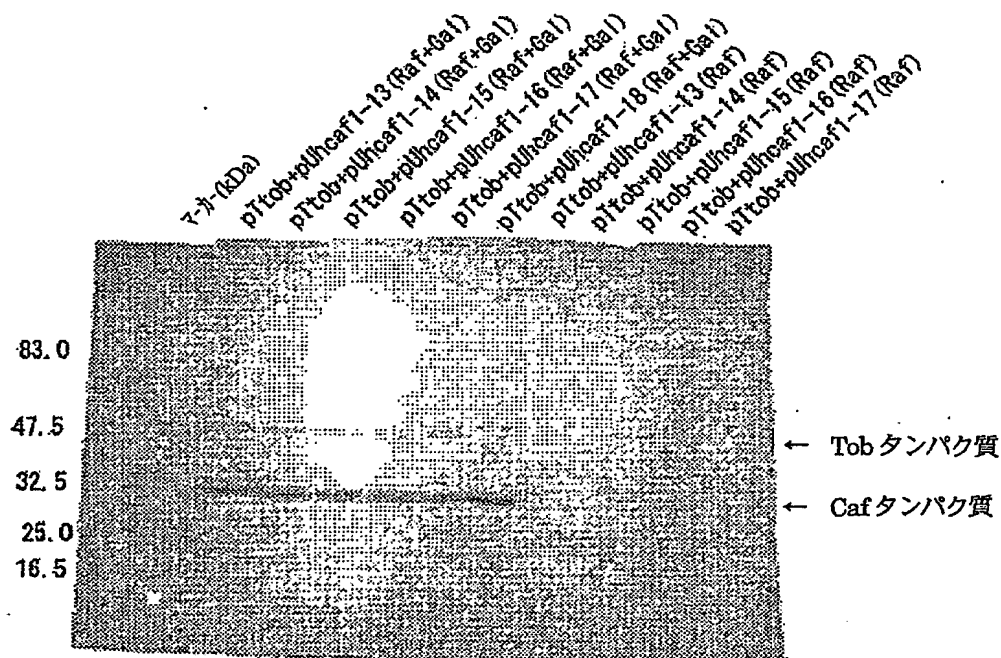


BEST AVAILABLE COPY

【図 5】

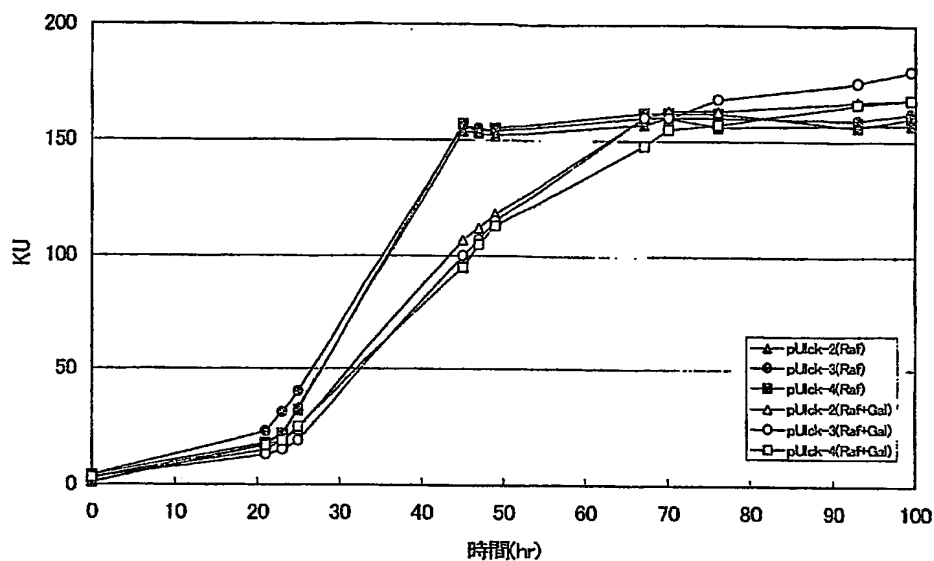


【図 6】



BEST AVAILABLE COPY

【図 7】



【図 8】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

生理活性物質を効率的にスクリーニングすることができる、呼吸能が欠損した酵母を使用する生理活性物質のスクリーニング方法、当該方法に使用される酵母、該スクリーニング方法により得られうる生理活性物質、ならびに該酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キットを提供すること。

【解決手段】

a) 異種タンパク質の発現が可能であり、かつ呼吸能が欠損した酵母と被験試料とを接触させる工程、ここで、該異種タンパク質は該酵母の生育状態に変化をもたらしうるタンパク質である、b) 該タンパク質を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、およびc) 酵母の生育状態を測定する工程を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育が低下もしくは向上する場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法；前記スクリーニング方法用の酵母；前記スクリーニング方法により得られうる生理活性物質；ならびに前記酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キット。

【選択図】 なし

特願 2002-280512

出願人履歴情報

識別番号

[301009597]

1. 変更年月日

2001年 2月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府富田林市若松町東1丁目9番32号

氏 名

株式会社生物技術研究所